

Contribution à l'étude
de la
PRÉCIPITATION SPÉCIFIQUE DES SÉRUMS

Détermination des modifications
de quelques constantes physiques des sérums mis en jeu ;
essai d'application de l'expérience de BORDET
à la précipitation

THÈSE

POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

SECTION DE PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement devant la Faculté de Médecine et de Pharmacie

Le 8 Décembre 1930

PAR

Georges MOULIN

Diplômé de Bactériologie et d'Hygiène

Né le 1^{er} Janvier 1907 à ROMANS (Drôme)



LYON

Imprimerie BOSC Frères & RIOU
42, Quai Gailleton, 42

1930

**Contribution à l'étude
de la PRÉCIPITATION SPÉCIFIQUE des SÉRUMS**

Contribution à l'étude
de la
PRÉCIPITATION SPÉCIFIQUE DES SÉRUMS

Détermination des modifications
de quelques constantes physiques des sérums mis en jeu ;
essai d'application de l'expérience de BORDET
à la précipitation

THÈSE

POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

SECTION DE PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement devant la Faculté de Médecine et de Pharmacie

Le 8 Décembre 1930

PAR

Georges MOULIN

Diplômé de Bactériologie et d'Hygiène

Né le 1^{er} Janvier 1907 à ROMANS (Drôme)



LYON

Imprimerie BOSC Frères & RIOU

42, Quai Gailleton, 42

1930



PERSONNEL DE LA FACULTE

Doyen honoraire	M. L. HUGOUNENQ
Doyen	M. J. LEPINE
Assesseur	M. ROLLET

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. AUGAGNEUR, CAZENEUVE, ROQUE, LANNOIS, HUGOUNENQ, ROCHET, BARRAL.

PROFESSEURS

Cliniques médicales	MM. PIC
Cliniques chirurgicales	PAVIOT
	TIXIER
	BERARD
	VORON
Clinique obstétricale et Accouchements	ROLLET
Clinique ophtalmologique	NICOLAS
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	LEPINE (J.)
Clinique neurologique et psychiatrique	MOURIQUAND
Clinique des maladies des enfants	VILLARD
Clinique des maladies des femmes	COLLET
Clinique d'oto-rhino-laryngologie	GAYET
Clinique des maladies des voies urinaires	NOVE-JOSSERAND
Clinique chirurgicale, infantile et orthopédie	CLUZET
Physique biologique, Radiologie et Physiothérapie	FLORENCE
Chimie biologique et médicale	MOREL
Chimie organique et Toxicologie	BRETIN
Matière médicale et Botanique	GUIART
Parasitologie et Histoire naturelle médicale	LATARJET
Anatomie	POLICARD
Histologie	DOYON
Physiologie	FROMENT
Pathologie interne	CADE
Pathologie et Thérapeutiques générales	FAVRE
Anatomie pathologique	PATEL
Chirurgie opératoire	ARLOING (F.)
Médecine expérimentale et comparée et bactériologie	Etienne MARTIN
Médecine légale	COURMONT (P.)
Hygiène	SAVY
Thérapeutique	LEULIER
Pharmacie et Pharmacologie	PIERY
Hydrologie thérapeutique et climatologie	

PROFESSEURS TITULAIRES SANS CHAIRE

Chargé d'un cours de Pathologie externe	MM. VALLAS
Propédeutique de gynécologie	CONDAMIN

CHARGES DE COURS COMPLEMENTAIRES

Anatomie topographique	MM. THEVENOT (Léon)
Puériculture et hygiène de la première enfance	RHENTER
Chirurgie expérimentale	TAVERNIER
Applications du radium	NOGIER
Stomatologie	TELLIER

AGREGES

MM.	MM.	MM.	MM.
NOGIER	CHALIER (Joseph)	MARTIN (Joseph)	CHAMBON
ROCHAIX	NOEL	ROCHET (Ph.)	CIBERT
RHENTER	DUMAS	WERTHEIMER	EPARVIER
MAZEL	DUFOURT	GATE	GUILLEMINET
SANTY	DEVIC	BERNHEIM	MORENAS
CHALIER (André)	GABRIELLE	DECHAUME	ROCHE
	MANCEAU	POLLOSSON	REBATTU ch

M. BAYLE, Secrétaire.

EXAMINATEURS DE LA THESE

MM. MOREL, *président* ; ROCHAIX, *assesseur* ;
MANCEAU et CHAMBON, *agregés*.

La Faculté de médecine de Lyon déclare que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle n'entend leur donner ni approbation ni improbation.

A LA MÉMOIRE INOUBLIABLE DE MA GRAND'MÈRE

A MA MÈRE, A MON PÈRE

Bien faible témoignage de mon affection.

A MON FRÈRE

A MON ONCLE, LE DOCTEUR DEVARS DE ROMANS

A TOUS MES PARENTS

MEIS ET AMICIS



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553603_0103

Avant-Propos

Arrivé au terme de notre vie d'étudiant, un devoir bien doux nous incombe: remercier et de tout cœur ceux qui ont bien voulu s'intéresser à nous, nous aider et nous marquer quelque sympathie.

Que M. le professeur Morel veuille bien trouver ici l'expression de notre respectueuse reconnaissance pour le grand honneur qu'il nous fait en acceptant d'être le président de notre thèse.

Nous avons trouvé auprès de M. le professeur Chevallier un accueil bienveillant et amical qui nous a rendu plus aisé un effort très ardu et plus légère une tâche qui eut été bien lourde pour nous seul. Qu'il nous permette de lui exprimer toute notre gratitude, la joie que nous avons ressentie tout récemment en le voyant accéder à une chaire magistrale, ainsi que le regret que nous cause son absence involontaire.

Nous remercions aussi bien vivement M. le professeur agrégé Rochaix. Au cours de ce travail, il a été pour nous le guide le plus clairvoyant et le conseiller le plus sûr. Nous conserverons de lui le souvenir d'un

maître bon et dévoué et nous l'assurons de notre profonde reconnaissance.

M. le professeur agrégé Manceau a bien voulu faire partie de notre jury. Il nous continue ainsi l'estime qu'il nous avait accordée pendant notre vie d'étudiant. Nous en sommes profondément touché.

M. le professeur agrégé Chambon nous a reçu de la façon la plus aimable lorsque nous sommes allé lui demander de bien vouloir être de nos juges. Nous l'en remercions bien vivement.

Nous voulons aussi que la soutenance de cette thèse soit pour nous l'occasion d'exprimer à tous nos maîtres de la Faculté notre reconnaissance pour l'enseignement précieux que nous avons reçu d'eux.

Nous avons eu le bonheur de faire notre stage officinal chez M. Reveillet, pharmacien à Valence, praticien émérite doublé d'un savant modeste. Nous nous efforcerons toujours de suivre les principes de conscience professionnelle et de respect de la pharmacie qu'il nous a inculqués.

Enfin, à tous ceux qui nous aidèrent au cours de nos travaux, à tous ceux qui pendant nos études nous ont témoigné de l'intérêt, nous sommes heureux d'adresser ici l'expression de notre amitié reconnaissante.

Contribution à l'étude
de la PRÉCIPITATION SPÉCIFIQUE des SÉRUMS

Introduction

Notre but en entreprenant ce modeste travail fut de déterminer quelques constantes physiques des sérums utilisés pour la précipitation spécifique et d'essayer de mesurer les modifications qu'elles pourraient subir au cours de ce phénomène.

Nous nous sommes proposé tout d'abord de déterminer la résistivité, l'indice de réfraction, et la tension superficielle des sérums employés avant, pendant et après la précipitation.

Nous voulions ensuite essayer d'appliquer l'expérience réalisée par Bordet sur l'agglutination (influence des électrolytes) à ce phénomène.

Le cours de nos expériences a légèrement modifié ces intentions; nous avons été entraîné à la détermination du rôle « du temps de dilution des sérums » à l'évaluation de la quantité d'albumines précipitées, à la reproduction du phénomène de Bordet sur diverses agglutinations et ceci explique la première partie de notre historique.

Le temps et aussi la difficulté rencontrée pour obte-

nir et surtout pour conserver les sérums précipitants ne nous ont pas permis de poursuivre nos recherches aussi loin que nous l'aurions voulu.

Nous n'avons donc pas résolu de façon complète les problèmes que nous avons étudiés. Les premiers résultats obtenus dans cette étude si difficile des phénomènes intimes de la précipitation spécifique nous ont cependant paru suffisamment intéressants pour faire l'objet de ce travail.

CHAPITRE I

Recherches antérieures sur le mécanisme de l'agglutination et de la précipitation spécifique

Agglutination spécifique

Dès 1889, Charrin et Roger découvraient l'agglutination des microbes en constatant que le bacille pyocyanique qui se développait d'une façon normale dans les sérums d'animaux normaux donnait des cultures d'aspect particulier dans les sérums d'animaux vaccinés. Dans ces derniers les bacilles s'allongent, donnent des filaments qui s'enchevêtrent et tombent au fond des tubes au lieu de pousser sous forme de bâtonnets : c'est le phénomène de l'agglutination.

Metchnikoff, en 1891, étend ce phénomènes aux vibrions de Gamaleïa et au pneumocoque. En 1893, Isaëff et Ivanoff mettent le même fait en évidence pour ce dernier microbe.

Bordet en 1891, lors de son étude de la bactériolyse des vibrions in vitro avait, lui aussi, constaté l'agglutination.

Peu de temps après, en 1896, Widal et Sicard remarquent que la mise en présence d'un microbe connu et d'un sérum d'animal vacciné dont on veut connaître la nature ou inversement donnent un moyen de détermination de l'un des deux éléments par suite de la spécificité de l'agglutination et fournissent ainsi un moyen précieux de séro-diagnostic.

Cette méthode fut employée par eux-mêmes pour le diagnostic précoce de la fièvre typhoïde. Wladimiroff et Mac Fadyean l'appliquent à la morve, Wright à la mélitococcie et Achard et Bensaude aux affections paratyphiques, S. Arloing et P. Courmont à la tuberculose.

Cette méthode sert encore à la différenciation des bacilles de la dysenterie : le sérum des animaux immunisés contre le bacille Shiga l'agglutine, mais il est sans action contre le Flexner, le sérum anti-Flexner agglutine le Flexner et le Hiss, alors que le sérum anti-Strong n'a d'action que sur le germe correspondant.

Ces quelques exemples montrent bien la place prépondérante qu'occupe l'agglutination dans la technique bactériologique moderne. Quelle est donc la cause de ce phénomène ?

L'action des sérums agglutinants serait due aux agglutinines. Ces dernières selon Ch. Nicolle et Halipie (pour le sérum thyphique en particulier) sont insensibles aux températures inférieures à 55° et elles ne passent pas à travers la membrane dialysante. Elles ne se conservent pas dans le sérum dilué (par contre, elles ne sont pas détruites dans le sérum desséché).

Elles sont très sensibles à l'action des acides et lorsqu'on précipite les globulines par le sulfate d'ammoniaque à demi-saturation les agglutinines se retrouvent dans la partie précipitée ; en outre les agglutinines apparaissent dans l'organisme humain ou animal au cours de l'infection, mais leur apparition est précoce et ne relève pas de l'immunité ; elles ne sont donc en quelque sorte que des témoins de l'infection.

De plus, on peut provoquer leur formation en immunisant des animaux, soit contre des microbes vivants, soit contre des microbes tués par la chaleur ou par les antiseptiques.

En effet, le microbe joue dans l'agglutination un rôle entièrement passif. Comme le montra Bordet en 1896, sa vitalité n'intervient pas. Des vibrions tués par le chloroforme s'agglutinent encore. Des microbes tués par chauffage à 56° se comportent de même (Vidal et Sicard, Van de Velde).

L'innoculation peut être faite sous la peau, dans le péritoine ; mais, intraveineuse, elle est plus efficace en ce sens que l'apparition de l'anticorps est un peu plus précoce et que la quantité d'antigène nécessaire semble moindre (Bordet). De plus, lorsqu'on immunise un animal simultanément contre plusieurs espèces microbiennes, l'organisme fabrique plusieurs agglutinines, chacune d'elles étant respectivement appropriée et combinable à chacun des microbes mis en jeu (Castellani) ; l'ingestion per os provoque aussi l'apparition de ces anticorps.

Le sérum de ces animaux préparés, d'une part, peut agglutiner les hématies (et ce fait a servi à Bordet de

point de départ à ses fameux travaux sur les sérums hémolytiques), les sérums neufs d'autre part ne sont pas dépourvus de l'aptitude à agglomérer les microbes; d'où la notion d'agglutinines normales (sérums neufs et préparés) et d'agglutinines spéciales (sérums préparés).

Enfin la répartition des agglutinines dans l'organisme est très semblable à celle des autres anticorps : comme eux, elles s'unissent aux antigènes qu'elles impressionnent spécifiquement, et cette combinaison est dans une certaine mesure réversible tout au moins lorsqu'elle contient un excès d'anticorps (Bordet).

Ces notions très générales sur les agglutinines étant posées, étudions maintenant le mécanisme de l'agglutination. Pour ce faire, résumons l'exposé qu'en donne Bordet dans son beau « Traité de l'immunité dans les maladies infectieuses ».

« La cause première de l'agglutination est sûrement, nous dit Bordet, l'union de l'anticorps à l'antigène ». Mais ceci n'est qu'un principe général dont de nombreux auteurs ont aussitôt essayé de donner l'explication.

Tout d'abord, Gruber et Durham ont imaginé que l'agglutinine rend les membranes des microbes visqueuses de façon à ce que ceux-ci puissent désormais adhérer les uns aux autres, mais le microscope n'a jamais permis d'observer une altération de ce genre et Bordet en discutant cette théorie a montré en 1899, qu'en injectant à des lapins du lait de vache on obte-

nait un sérum agglutinant la caséine de ce lait en flocons.

D'après Paltauf, le phénomène initial serait celui que Krauss avait mis en évidence en 1897, à savoir que les microbes déverseraient autour d'eux dans le liquide ambiant des produits susceptibles de se coaguler sous l'influence du sérum et de se condenser en flocons lesquels entraîneraient secondairement les microbes dans leur propre condensation. Mais, d'autre part, cependant la production intra-cellulaire d'un précipité n'est nullement indispensable à l'agglomération des éléments organisés (ainsi des globules rouges parfaitement lavés, s'agglutinent très bien lorsqu'on les additionne d'immunsérum).

Pour Bordet (1899), le processus total de l'agglutination comprend deux phases. La première est l'union de l'antigène à l'anticorps due à l'intervention des affinités spécifiques ; la seconde est du domaine de la physico-chimie, c'est la réunion en amas. Il s'est en somme formé un complexe antigène-anticorps doué de propriétés différentes de celles de ses constituants, mais comparables à celles que manifeste une foule de corps en suspension : argile finement pulvérisée dans de l'eau distillée, solution alcoolique de mastic ou de gutta, etc.

Il faut, comme on le sait, pour que promptement des flocons apparaissent, puis se déposent dans de telles suspensions (le liquide surmontant le dépôt devenant alors limpide) ajouter un électrolyte, quelques gouttes d'une solution de sel marin par exemple.

Si donc, suivant l'exposé de Bordet nous admettons que les propriétés du complexe antigène et anticorps

sont les mêmes que celles des particules d'argile ou de mastic, il faut prévoir que l'intervention de l'électrolyte sera aussi indispensable dans le premier cas que dans le second. Il nous en donne d'ailleurs l'exemple suivant qui est la base même de son interprétation du mécanisme de l'agglutination.

« Une suspension de vibrions cholériques dans la solution physiologique de chlorure de sodium, additionnée d'un peu de sérum anticholérique, et dans laquelle l'agglutination s'est effectuée est soumise à la centrifugation. Si, ayant décanté le liquide surnageant, on le remplace par un volume égal de nouvelle solution physiologique dans laquelle, en agitant, on délaye le sédiment microbien, on constate que cette émulsion, abandonnée à elle-même, se réagglutine parfaitement au bout de quelques minutes. Il n'en va pas de même si, au lieu de solution saline, on verse de l'eau distillée sur le dépôt de microbes : le trouble homogène de la suspension obtenue par agitation se maintient, on ne voit pas de flocons, les vibrions restent disséminés. Mais rapidement les amas se reforment lorsque, par addition d'un peu de solution concentrée de chlorure de sodium, on restitue à l'émulsion une teneur saline semblable à celle de la solution physiologique. C'est donc le sel qui manquait ; c'est lui qui déclanche l'agglutination des microbes qui tout d'abord ont fixé l'anticorps. L'action du sérum sur l'antigène comporte donc deux opérations successives, formation du complexe anticorps-antigène, agglutination de ce complexe par le sel. Et, de ces deux phénomènes distincts et consécutifs on peut, en éliminant le sel, supprimer le second. Ce qui agglutine, c'est donc le sel et non l'agglutinine, celle-ci se bornant à engendrer avec l'antigène un produit doué d'un caractère très répandu parmi les matières à l'état d'émulsion colloïdale et qui est l'agglutinabilité ».

Telle est l'expérience de base de Bordet ; d'autre part, Joos est allé jusqu'à admettre que l'union de l'agglutinine et du microbe peut s'opérer même en l'absence de sel, sans, bien entendu, que l'agglutination apparaisse. En outre, le grand bactériologiste Belge conclut ainsi : « En résumé, il résulte de ces faits, que l'agglutination, phénomène si frappant et qu'on croirait si caractéristique, est en réalité un processus secondaire. L'essentiel au point de vue de l'immunité, c'est l'union de l'anticorps à l'antigène ; c'est à ce moment que la spécificité intervient. Le fait que certains antigènes acquièrent, en se soudant à leur anticorps, cette qualité d'ailleurs très banale d'être flocculables par les électrolytes est théoriquement accessoire. Mais il attire vivement l'attention parce qu'il rend la réaction très perceptible à nos sens, et c'est pourquoi l'anticorps en jeu s'appelle agglutinine lorsqu'il s'agit de pareils antigènes ».

Voyons maintenant d'une façon succincte quelles sont les variations constatées dans l'action de divers électrolytes, et de certains corps non électrolytes capables de provoquer l'agglutination.

Joos, Friedberg, ont remplacé le chlorure de sodium par d'autres sels, tels que les iodures, bromures et phosphates alcalins. Le chlorure de calcium en particulier se montre très actif. Les sels de métaux lourds se comportent de façon différente ; les sels magnésiens altèrent l'antigène en le rendant inagglutinable, d'autres s'unissent à lui, pour donner lieu à la formation de complexes particuliers.

Les acides ainsi que l'a montré Malvoz exercent eux-

même une action flocculante très nette sur les microbes, mais cependant, Porges, Teague et Buxton ont montré que des doses d'acides trop faibles pour agglomérer des bactéries normales agglutinent, comme le ferait le sel marin, des bactéries qui ont absorbé l'anticorps.

De nombreux auteurs d'autre part, ont montré la floculation des bactéries ou des globules par des colloïdes organiques ou inorganiques, des métaux colloïdaux ou des hydrates métalliques. Tels sont : Landsteiner et Jagic, Gengou (1904) et plus tard, Bechhold, Neisser et Friedemann, Friedberg, Biltz, V. Henri et P. Girard, Mangin, Porges, (etc...)

Ainsi donc, la perception du phénomène de l'agglutination est lié à la présence de l'électrolyte et même comme le dit Wells : « Il ressort d'une observation importante de Bordet que l'agglutination ne se produit pas lorsque la suspension bactérienne et le sérum agglutinant sont séparés des sels par dialyse avant d'être mélangés, l'addition d'une minime quantité de chlorure de sodium à ces mélanges provoque immédiatement l'agglutination et la précipitation des bactéries. (Porges, cependant, déclare qu'un immunsérum très puissant serait capable de provoquer l'agglutination même en absence de sel ; mais Northrop et De Kruif ont montré que dans ces conditions l'agglutination n'est pas complète, l'effet obtenu étant analogue à celui qu'on observe avec un sérum normal dialysé.)

En outre, Bordet compare ce phénomène « à la précipitation des particules minérales en suspension dans l'eau douce des rivières à l'endroit où celles-ci rencontrent l'eau salée de l'Océan ».

Il a également montré que les agglutinines se combinent avec les bactéries en l'absence de sel et que le composé obtenu est précipité par addition de faibles quantités d'électrolytes, incapables par elles-mêmes de précipiter ou d'agglutiner les bactéries ou de précipiter le sérum.

L'agglutination comporte donc deux phases différentes :

1° La fixation de l'anticorps par les cellules;

2 L'agglomération subséquente des cellules, et cette fixation, dit Nicolle, obéit à la règle prévue par Bordet et exprimée par Einsenberg et Wolk dans les termes suivants : « Pour une même masse de cellules, la quantité absolue d'anticorps fixée est directement proportionnelle à la concentration de l'anticorps, la quantité relative inversement ».

Voici donc exposé le phénomène de l'agglutination. Nous avons plus spécialement rapporté ici les avis de deux grands spécialistes de la question Bordet et Wells. Tous les deux expliquent le phénomène de l'agglutination d'une façon analogue et tous les deux concluent que, pour être apparent et complet, il exige toujours la présence d'un électrolyte, en particulier le chlorure de sodium.

Précipitation spécifique

A l'heure actuelle, on tend de plus en plus à remplacer le terme précipitation par le mot floculation. Cette préférence s'explique car le terme de floculation rappelle l'origine colloïdale du phénomène alors que

le terme de précipitation pourrait entraîner une comparaison inexacte avec un phénomène chimique. Toutefois, ces deux mots semblent désigner le même phénomène et par suite peuvent s'employer indifféremment.

Wells dans son livre : « Les aspects chimiques de l'immunité » nous dit : « L'agglutination et la précipitation relèvent d'un processus de même nature et ne diffèrent que par les dimensions des particules colloïdales. »

Bordet dit aussi « Il est évident que ces phénomènes de floculation sont de même essence que celui de l'agglutination microbienne et justiciables de la même interprétation ».

Voyons donc en quelques mots le phénomène de la précipitation, ses causes et son mécanisme.

Krauss en 1897, et Nicolle en 1898, ont constaté que l'addition d'un sérum antibactérien, choléra par exemple, au bouillon filtré de la culture du microbe correspondant, donne lieu à la formation d'un précipité qui a été attribué à l'existence dans le sérum d'une substance spécifique que l'on a appelée « précipitine ».

De même que Krauss avait obtenu une précipitine bactérienne, Tchistovitch a préparé une albumino-précipitine en injectant aux lapins du sang de cheval et d'anguille. Le sérum des lapins préparés précipite le sang qui a servi à l'immunisation.

Bordet a obtenu le même résultat avec le sérum de lapin traité par le sang défibriné de poule et Jacoby

(1900), Kowarski (1901) obtinrent également des précipitines susceptibles d'agir sur des matières végétales.

En bactériologie, de nombreux microbes peuvent fournir des filtrats précipitables : Coli, morveux, pyocyanique, prodigiosus, dysentérique, méningocoque, (Dopter), diphtérique et pseudo-diphtérique (Schwoner, Wassermann), le pneumocoque (Neufeld), le charbon (Bail, Ascoli), les levures (Schutze), le bacille tuberculeux (Kitajama), etc.

De plus, divers auteurs tels Frierer, Casagrandi, Tomarkin et Suarez (1917) ont même admis l'existence dans le sérum de sujets qui ont subi la vaccination jennérienne, de précipitines actives sur les extraits de pustules vaccinales.

Ces précipitations ont donné naissance à une méthode de précipito-diagnostic. Le liquide céphalo-rachidien par exemple de malades atteints de méningite cérébrospinale se trouble par addition d'un cinquième environ de sérum antiméningococcique (Vincent et Bellot, 1909). Ascoli (1909) donne une intéressante méthode de diagnostic du charbon basée sur la précipitation ; Vallée et Finzi (1910) se servent de cette réaction pour déceler par le sérum de cheval hyperimmunisé contre la tuberculine les bovidés gravement tuberculeux. D'après Schurmann (1915), les décoctions d'organes d'animaux morts de pneumococcie donnent un précipité sous l'influence de l'immunsérum correspondant.

D'autre part, l'action précipitante des précipitines nous amène à nous demander si les toxines elles-mêmes ne sont pas précipitées. De prime abord, rien

ne paraît s'opposer à ce qu'un principe déterminé soit à la fois vénéneux et précipitable, et à ce que son anticorps fonctionne simultanément comme antitoxine et comme précipitine ; mais il se peut aussi que la toxine soit entraînée d'une façon mécanique dans la précipitation de matériaux qui lui sont étrangers. Ainsi dans le sérum antitoxique qui neutralise le sérum d'anguille le pouvoir précipitant ne marche pas régulièrement de pair avec le pouvoir antitoxique (Tschistovitch).

On a mis beaucoup d'insistance à rechercher si les antigènes qui, dans les corps des microbes sont responsables de l'agglutination, s'identifient avec ceux qui dans les cultures liquides et limpides se flocculent sous l'influence de l'immunsérum. Bordet, d'autre part, déclare : « Il est hautement vraisemblable que l'antigène en jeu dans l'agglutination est susceptible de se diffuser en proportion plus ou moins grande dans le milieu ambiant, et d'y être précipité lorsqu'on y ajoute l'anticorps. » Il règne donc une assez grande incertitude dans la parrallélisme entre le pouvoir précipitant et les pouvoirs antitoxique et hémolytique (seul le pouvoir sensibilisateur de l'immunsérum va de pair avec son pouvoir précipitant).

Mais cependant la précipitation a donné lieu à de nombreuses applications pratiques : en médecine légale, la réaction d'Uhlenhuth pour la détermination de l'origine des taches de sang ; en sérologie, pour l'explication des accidents sériques et anaphylactiques ; dans l'Industrie, pour la différenciation des albumines humaines et animales (exception faite pour celles des singes anthropomorphes) ; en clinique pratique, enfin,

pour rechercher la simulation d'albuminurie en quelques minutes, au cours des visites médicales et chez les malades relevant des accidents du travail (Hollande et Gaté).

A vrai dire, on appelle précipitines et non agglutinines les anticorps qui sont la cause du fait constaté par Krauss en 1897, à savoir que les immunsérums peuvent faire naître un précipité dans les filtrats limpides de cultures microbiennes.

Ces anticorps sont, selon les notions classiques, résistants à la chaleur (56°) ; ils ne sont pas isolés, se précipitent avec les globulines des sérums (méthode de Vallée pour l'obtention des anticorps hyperactifs) et selon la théorie d'Erlich, comporteraient un groupe haptophore par lequel ils s'uniraient à la molécule protéique et un groupe qui déterminerait la précipitation. On n'a pu, en outre, jusqu'à l'heure actuelle obtenir des précipitines pour les lipoides et pour les substances non protéiques, mais peut-être est-il possible de préparer des précipitines pour les colloïdes de dimensions moléculaires analogues à celles des précipitines, et en particulier pour certaines substances présentes dans les filtrats de cultures microbiennes débarrassées de protéines.

Les précipitines enfin apparaissent généralement dans le sang, six jours environ après l'injection de la protéine, elles disparaissent après chaque nouvelle injection de protéine pour reparaître assez rapidement. Elles ne sont jamais éliminées par l'urine, mais elles

peuvent traverser le placenta et pénétrer dans la circulation fœtale (Wells).

Le précipité serait constitué par la protéine antigénique transformée en un produit insoluble par action de la précipitine.

Sa formation cependant, n'est pas un fait rigoureusement constant: il dépend de nombreux facteurs comme l'a montré Dean : temps, concentration, ordre dans lequel s'effectue le mélange. L'état de dilution des antigènes et anticorps est également d'une grande importance. La pression, comme l'indique Muller, intervient aussi dans la production du phénomène. De plus, la spécificité des précipitines n'est pas absolue (un sérum précipitant un sang de chèvre peut aussi précipiter un sang de mouton) et la formation des précipitines non spécifiques dépend du choix de l'animal et de l'intensité de l'immunisation. Les rapports des volumes antigène-anticorps sont donc à préciser dans chaque cas particulier afin de pouvoir opérer dans les conditions optima.

La rapidité d'apparition des précipités est variable et souvent la chaleur (38°) active leur formation (Gengou). La précipitation peut en outre, donner lieu à un précipité invisible car le produit de la réaction n'est pas nécessairement insoluble dans toutes les conditions de l'expérience.

Enfin, un phénomène particulier nommé « phénomène de Zone » dans les pays Anglo-Saxons et phénomène paradoxal » en France, se produit parfois au cours de précipitations dont les réactifs obéissent aux lois qui régissent les précipitations colloïdales. Dans ce

cas, la précipitation ne se produit que dans des limites définies de concentration des réactifs.

Ce fait, noté par Wells, fut étudié plus particulièrement par Rochaix, Le Bourdelles et L. Brun qui vérifièrent et confirmèrent les lois de Fleishmann et Michaelis sur la formation du précipité, à savoir :

1° Pour une quantité donnée de précipitogène, la masse du précipité est proportionnelle à la quantité de précipitine.

2° Si on ajoute à une quantité donnée de précipitine des quantités progressives de précipitogène, la masse de précipité obtenue croît d'abord proportionnellement, puis décroît et tend vers zéro pour un certain excès de précipitogène. Ce phénomène est connu sous le nom de « phénomène de Zone ».

3° Pour des quantités constantes des deux réactifs, la quantité de précipité obtenue est inversement proportionnelle au volume de liquide utilisé dans la réaction.

L'absence de précipitation ou la redissolution du précipité sont plus évidentes avec un excès d'antigène qu'avec un excès d'anticorps. Le « phénomène de Zone » est quantitativement spécifique, l'antigène protéique possède seul un effet inhibiteur complet.

Au point de vue chimico-physique, la concentration en ions H n'a pas une grande influence sur la réaction de précipitation (comme pour l'agglutination d'ailleurs). Elle est compatible avec une variation de pH de 4,5 à 9,5 et elle n'est pas plus abondante au point isoélectrique de la sérum globuline ou de l'antigène ; au delà de ces limites de pH la précipitation ne se

produit pas et tout précipité est redissous (Mason). Il est à noter que, dans les réactions non spécifiques, le maximum de floculation se produit au point isoélectrique.

Un excès de viscosité s'oppose à la floculation. C'est ainsi que la simple addition de glycérine à un mélange de sérum précipitant et de floculigène correspondant diminue fortement la précipitation spécifique (Rochaix, Le Bourdelles et Brun).

Traube a attiré l'attention sur le rôle de la tension superficielle dans la floculation et Kopaczewski indique que toute condition qui élève la tension superficielle facilite la floculation des colloïdes.

E.-F. Hirsh considère les réactions de précipitation résultant de l'action d'un antigène sur un immunosérum homologue, comme étant de même nature que celle des colloïdes. La précipitation d'un colloïde par un autre résulte de leurs charges électriques opposées et le précipité obtenu contient les deux colloïdes. Comme le mentionne Wells, Blitz, a donné pour ces réactions les lois suivantes :

« L'addition à une solution colloïdale d'une petite quantité de colloïde de signe opposé ne produit pas de précipitation. Si on augmente la quantité de colloïde ajouté, l'action coagulante se développe parallèlement jusqu'à une certaine proportion qui produit une coagulation immédiate; si on continue à ajouter le colloïde, la coagulation s'arrête ».

Ces lois, comme on le voit, se rapprochent beaucoup de celles de Michaelis et Fleischmann.

D'autre part, Hirsch a noté l'augmentation d'alca-

linité du milieu, lors de la précipitation du sérum humain par l'immunsérum homologue ; mais cependant, les tentatives d'explications des réactions de précipitation basées sur la physico-chimie n'ont pas été jusqu'ici favorablement accueillies.

Hirsch a essayé d'interpréter les réactions de précipitation au double point de vue colloïdal et chimique. Il suppose que des enzymes appartenant aux ferments de défense d'Abderhalden désintègrent l'antigène protéique et par libération des acides aminés amènent le pH du mélange au point isoélectrique de la sérumglobuline qui est alors précipitée.

Les déterminations réfractométriques de Langenstrass sont conformes à cette hypothèse. Par contre, les travaux de Doer et Berger et de Bachmann ne lui sont pas favorables. Ces auteurs n'ont pas, en effet, observé de modifications de l'indice de réfraction au cours des réactions de précipitation.

Ces données très générales sur le phénomène de la précipitation montrent toute la difficulté d'interprétation de son mécanisme.

Toutes les théories émises à l'heure actuelle ne sont que de fragiles hypothèses, car une explication même approchée nécessiterait des connaissances plus approfondies des phénomènes colloïdaux et des notions plus précises sur les anticorps normaux ou d'immunisation des sérums mis en jeu.

CHAPITRE II

Détermination des modifications de quelques constantes physiques des sérums pendant le phénomène de la précipitation spécifique

Avant d'exposer les techniques et les résultats des expériences que nous avons réalisés, nous devons donner quelques précisions sur les méthodes générales employées.

Tout d'abord, nous avons choisi comme sérum précipitant le sérum de lapin anti-cheval afin d'éviter la présence des précipitines normales. En effet, lorsqu'on choisit, par exemple, le sérum de mouton comme immunosérum ce dernier précipite en général facilement le sérum de chèvre par suite de la présence de ces précipitines normales.

D'autre part, nous avons effectué les manipulations le plus souvent possible au moyen de réceptacles stériles.

Enfin, nous devons prévenir que les valeurs absolues indiquées pour chaque constante physique d'un même

sérum ne sont pas les mêmes pour chaque mesure. Nous n'en affirmons pas moins dans nos conclusions que ces constantes physiques n'ont pas varié pendant le phénomène de la précipitation, et ceci est montré par leurs valeurs comparatives qui sont très sensiblement constantes.

§ 1. — **Obtention du sérum anti-cheval**

Nous avons injecté à des lapins neufs et par voie sous-cutanée les doses suivantes de sérum de cheval normal : une première fois 2 cc. 5, huit jours après 2 cc. 5, huit jours après 5 cc., huit jours après 10 cc.

Nous avons enfin procédé à trois injections intrapéritonéales de 3 cc. de sérum de cheval à quarante-huit heures d'intervalle. Ces lapins saignés à blanc de façon aseptique par prise de sang dans le ventricule gauche, une douzaine de jours après la dernière injection nous ont procuré le sérum de lapin anti-cheval, base de nos expériences.

§ 2. — **Reproduction de la précipitation et détermination des conditions optima, pour les sérums employés**

Une quantité constante de précipitine (sérum de lapin anti-cheval dilué au 1/40, au moyen d'eau physiologique à 80 0/00) soit 30 gouttes et des quantités crois-

santes de précipitogène (1) (sérum de cheval normal dilué au 1/2) soit 8, 9, 10, gouttes etc... ont été placées à l'étuve à 38°, après agitation énergique.

L'observation des faits nous montre alors que pour les sérums et les doses employés la précipitation est macroscopiquement visible après 15' d'étuve environ et les résultats qualitatifs peuvent se traduire par le tableau suivant :

Précipitine	Précipitogène	Précipite
30 gouttes	8 gouttes	+
30 —	9 —	++
30 —	10 —	++
30 —	12 —	+++
30 —	12 —	+++
30 —	16 —	+
30 —	18 —	+
30 —	21 —	±
30 —	24 —	±

Ce tableau nous donne donc les quantités de sérums à employer pour obtenir une précipitation optima. Il nous permet également de vérifier la deuxième loi de Michaelis et Fleischmann : « Si on ajoute à une quantité donnée de précipitine des quantités progressives de précipitogène, la masse de précipité obtenue croît d'abord proportionnellement puis décroît et tend vers zéro pour un certain excès de précipitogène. »

D'autre part, les mêmes essais réalisés avec de la

(1) (Toujours identique à lui-même, car prélevé en une seule fois sur un même cheval et conservé en récipient stérile).

précipitine diluée au $1/20^{\circ}$ donnent des résultats pratiquement inappréciables.

Enfin ces essais repris le lendemain avec des sérums dilués de la veille semblent donner des résultats plus nets. ⁽¹⁾.

§ 3. — Détermination de quelques constantes physiques des sérums employés pour la précipitation

1° RÉSISTIVITÉ. — Nous avons déterminé la résistivité par la méthode du pont de Kohlrausch au moyen de la cellule d'Oswald.

Soit : A le sérum de cheval dilué au $1/2$.

B le sérum de lapin anti-cheval dilué au $1/10$.

C le mélange des deux sérums surmontant le précipité après la précipitation.

Nous avons : A : R = 110 φ
 B : R = 100 φ T = 23°
 C : R = 100 φ

2° INDICE DE RÉFRACTION. — Nous avons déterminé l'indice de réfraction au moyen du grand réfractomètre de Fery.

Nous avons : A : n = 1,3401
 B : n = 1,3360
 C : n = 1,3370 T = 23°
 D : n = 1,3377

(D est le mélange des deux sérums avant la précipitation).

3°. TENSION SUPERFICIELLE. — Nous avons déterminé la tension superficielle au moyen de l'appareil du Laboratoire de physique de la faculté des Sciences de Lyon qui permet de mesurer la tension superficielle entre des liquides non miscibles (2).

Les résultats obtenus et exprimés en dynes par c. m. sont :

	A : Benzène	T. S. = 22 dynes
	A	
T = 23°	B : Benzène	T. S. = 32 dynes
	B	
	C : Benzène	T. S. = 32 dynes
	C	

§ 4. — Rôle du " temps de dilution des sérums " dans la précipitation

Par « temps de dilution des sérums » nous entendons le laps de temps durant lequel nos sérums restent (séparément) dilués d'eau physiologique avant leur mélange pour la précipitation.

Nous basant donc sur notre remarque (1) (page 34) à savoir que la précipitation nous avait semblé plus nette dans le cas de sérums dilués de la veille, nous avons pré-

(2) a) Lemunde: Société de physique (mars 1929).

b) A. Chevallier et Lemunde: physique Société de (juin 1929).

paré des dilutions de sérums identiques à celles de l'expérience préliminaire et, après les avoir mélangées, nous les avons laissées à l'obscurité durant des espaces de temps différents :

A A'	B B'	C C'
0 heure	20 heures	90 heures

Après deux heures d'étuve nous constatons un précipité environ trois fois plus abondant pour C C' que pour A A'. Après quatre heures d'étuve A A' se rapproche très sensiblement de C C' et après 24 heures d'étuve les trois précipités et les trois liquides les surmontant sont macroscopiquement identiques.

Nous avons alors déterminé :

a) POIDS DU PRÉCIPITÉ. — Après centrifugation de 20' et décantation nous avons desséché les précipités sous le vide sulfurique et les mesures effectuées par double pesée nous ont donné les résultats suivants :

Précipité A A' = 0 gr., 0163
— B B' = 0 gr., 0160
— C C' = 0 gr., 0165

b) RÉSISTIVITÉ. — Nous avons déterminé les résistivités ainsi que les indices de réfraction et les tensions superficielles sur les liquides (mélange des deux sérums après précipitation et décantation) qui surmontaient les précipités.

Liquide A A' : R = 80 φ .
— B B' : R = 80 φ . T. = 23°
— C C' : R = 80 φ .

c) INDICE DE RÉFRACTION.

Liquide A A' : $n = 1,3368$

— B B' : $n = 1,3370$ T. = 23°

— C C' : $n = 1,3370$

d) TENSION SUPERFICIELLE.

Liquide A A' : Benzène

A A' T. S. = 24 dynes

T. = 23° Liquide B B' : Benzène

B B' T. S. = 24 dynes

Liquide C C' : Benzène

C C' T. S. = 27 dynes

Donc, comme le montrent ces résultats, les « temps de dilution des sérums » ne semblent pas avoir un rôle sensible sur le poids du précipité ni sur les constantes physico-chimiques du complexe surnageant. C'est tout au plus si on peut noter un très léger accroissement dans la vitesse de formation du précipité.

Cette expérience toutefois a l'avantage de nous montrer que les précipitines conservent toute leur activité pendant un temps assez long dans les sérums dilués (une expérience semblable sur des sérums dilués durant 220 heures nous a donné les résultats identiques) alors que Ch. Nicolle et Halipie avaient montré la non résistance des agglutinines à la dilution.

§ 5. — Détermination de la quantité d'albumines des sérums précipitées

Au cours des pesées de l'expérience précédente, nous avons en outre remarqué que 21 cc. du complexe formé

de nos sérums (c'est-à-dire 3 cc. de sérum de cheval et 1 cc. 5 de sérum de lapin anti-cheval) que nous appellerons C correspondaient à 0 gr. 016 de précipité; or, 21 cc. de C sont formés de 4 cc. 5 de sérums purs et 16 cc. 5 d'eau physiologique à 8 0/00; donc 1.000 cc. de C ren-

ferment $\frac{4,5 \times 1000}{21} = 215$ cc. de sérums purs.

Si on admet une teneur de 80 grs d'albumines par litre de sérums de lapin et de cheval, ces 215 cc. renfer-

ment $\frac{80 \times 215}{1000} = 17$ grs 2 d'albumines, les 4 cc. 5 de

sérums de C en renferment $\frac{17,2 \times 4,5}{215} = 0$ gr. 31.

Nous avons donc une précipitation de $\frac{0,016}{0,31}$, soit très

sensiblement $\frac{1}{20}$ des albumines.

VÉRIFICATIONS : d'autres mesures de la résistivité et de l'indice de réfraction de nos divers éléments nous ont à plusieurs reprises donné des résultats très sensiblement identiques, entre autres :

RÉSISTIVITÉ :

Eau salée à 8 0/00 R = 90 φ

A (sérum de cheval dilué au
1/2) R = 100 φ

B (sérum de lapin anti-cheval
au 1/10) R = 90 φ

B' (sérum de lapin anti au 1/10, sans dépôt pinctiforme dû à dilution)	R = un peu moins de 90 φ
C (mélange des 2 sérums sur- montant précipité)	R = 90 φ
X (sérum de cheval 3 cc., 16 cc. 5 eau salée, c'est-à-dire dilution sérum cheval + eau salée, pour les conditions op- tima de précipitation à la- quelle il ne manque que le sérum de lapin anti-cheval)	T = 19° R = un peu moins de 90 φ

INDICE DE RÉFRACTION :

Eau salée à 80/000	n = 1,3348	
A	n = 1,3401	
B	n = 1,3359	T = 19°
B'	n = 1,3360	
X	n = 1,3364	
D (mélange des 2 sérums avant la précipitation)	n = 1,3373	

§ 6. — Influence de la chaleur

Essai de précipitation avec un sérum de lapin anti-cheval chauffé durant 30' à 60-62°.

Dans ce cas, la précipitation est très notablement diminuée ou en tout cas fortement retardée, car au bout de 20 heures d'étuve le mélange des sérums est louche mais sans précipité sensible.

§ 7. — Influence de la dessiccation

Nous avons desséché sous la cloche à vide sulfurique 1 cc. 5 de sérum de lapin anti-cheval durant 200 heures. Le résidu, soigneusement émulsionné dans 1 cc. 4 d'eau distillée, nous a donné un liquide semblable au sérum initial.

Cette émulsion, diluée d'eau physiologique à 8 0/00 et additionnée de sérum de cheval normal dans les conditions habituelles, nous donne dans un temps analogue un précipité identique à celui obtenu en partant du sérum non desséché.

Les propriétés précipitantes des précipitines ne semblent donc pas altérées par 200 heures de dessiccation sous le vide sulfurique.

CHAPITRE III

Essais d'application de l'expérience de Bordet à la précipitation spécifique des sérums

Dans ce chapitre, nous exposons les résultats que nous avons obtenus en appliquant l'expérience de Bordet au phénomène de la précipitation.



Dans une première expérience, après avoir préparé des précipitations dans les conditions habituelles, nous avons centrifugé les mélanges trois fois durant dix minutes, chaque centrifugation étant suivie d'un lavage du précipité à l'eau distillée.

La quantité de mélange de sérums surnageant chaque précipité est alors remplacée par un volume équivalent de solutions N/5 d'électrolyte et d'eau distillée dans l'ordre suivant :

Tube 1	Tube 2	Tube 3	Tube 4
H ² O	NaCl	CaCl ²	AlCl ³

Après agitation modérée, nous avons mis ces tubes à l'étuve à 38°. Après 30', 1 et 2 sont analogues, homogènes, de teinte bleutée et sans dépôt; 3 présente peut-être un très léger début de précipitation, 4 nous montre un liquide plus transparent sans teinte bleutée et on a l'impression vague d'un début de légère précipitation granuleuse s'accrochant aux parois du tube.

Après séjour prolongé, les précipités semblent correspondre à ceci :

Tube 1	Tube 2	Tube 3	Tube 4
++	+++	++++	+

Nous avons alors procédé aux mesures suivantes :

INDICE DE RÉFRACTION :

Eau salée à 8 0/00	n = 1,3348	
Sérum de cheval 3 cc. + eau salée 16 cc. 5	n = 1,3365	T = 19°
Mélange des 2 sérums avant la précipitation	n = 1,3377	
Mélange des 2 sérums après la précipitation et centri- fugation	n = 1,3380	

RÉSISTIVITÉ :

Eau salée à 8 0/00	R = 90 φ	
Sérum de cheval 3cc. + eau salée 16 cc. 5	R = 90 φ	
Mélange des 2 sérums avant la précipitation	R = 90 φ	T = 19°
Mélange des 2 sérums après la précipitation et centri- fugation	R = 90 φ	

Dans une deuxième expérience, nous avons opéré sur 13 cc. de mélange pour précipitation dans chaque tube. Après centrifugations, lavages, addition d'électrolytes (13 cc.) et agitation modérée, au bout d'un repos de 30' l'ordre de limpidité décroissante semble être : 2, 4, 3, 1 (faible différence entre 3 et 1. Quinze heures plus tard, dans tous les tubes les liquides sont limpides et les précipités rassemblés au fond. Après cinq minutes d'une agitation modérée, on constate un trouble et une homogénéité légèrement plus grande dans le tube n° 1.

Tous les tubes semblent renfermer des liquides bleutés sauf 2 qui paraît gris jaunâtre. Après dix-sept heures (sans agitation) 2 et 4 sont les plus limpides, 3 est moins limpide que 2 et 4 mais ne l'est guère plus que 1. Après 20 heures et 24 heures pas de changement.

Nous avons alors procédé aux pesées suivantes :

Poids des tubes avec précipité :

Tube n° 1 50 grs. = Tube + précipité + 5,0144

Tube n° 2 50 grs. = Tube + précipité + 6,3451

Tube n° 3 50 grs. = Tube + précipité + 5,2396

Tube n° 4 50 grs. = Tube + précipité + 4,7965

Poids des tubes avec précipité après contact avec les électrolytes :

Tube n° 1 (H_2O) 50 grs. = Tube + précipité + 5,0154

Tube n° 2 (NaCl) 50 grs. = Tube + — + 6,3443

Tube n° 3 (CaCl_2) 50 grs. = Tube + — + 5,2339

Tube n° 4 (AlCl_3) 50 grs = Tube + — + 4,7915

Différence de poids entre les précipités avant et après le contact avec les électrolytes :

Tube n° 1 diminution de	0,013
Tube n° 2 augmentation de	0,0008
Tube n° 3 —	0,0057
Tube n° 4 —	0,0050

Dans ce cas également nous avons remarqué que les poids des précipités correspondent aussi très sensiblement au $1/20^{\circ}$ des albumines.

Les indices de réfraction et les résistivités sont :

INDICES DE RÉFRACTION DES EAUX DE LAVAGE :

Eau de premier lavage	$n = 1,3330$
Eau de deuxième lavage	$n = 1,3329$ $T = 17^{\circ}$
Eau de troisième lavage	$n = 1,3330$

RÉSISTIVITÉ DES EAUX DE LAVAGE :

Eau de premier lavage	$R = 3.250 \varphi$
Eau de deuxième lavage ...	$R = 50.250 \varphi$ $T = 17^{\circ}$
Eau de troisième lavage ...	$R = 102.750 \varphi$

INDICE DE RÉFRACTION :

Liquide 1 (Eau distillée après contact avec le pré- cipité)	$n = 1,3335$
Liquide 2 (NaCl et eau dis- tillée après contact avec le précipité)	$n = 1,3342$ $pH = 6$
Liquide 3 ($CaCl^2$ et eau dis- tillée après contact avec le précipité)	$n = 1.3365$ $pH = 7$ $T = 17^{\circ}$

Liquide 4 (AlCl_3 et eau distillée après contact avec le précipité) $n = 1,3364$ $\text{pH} = 4$
Eau distillée (sans contact avec le précipité) $n = 1,3323$
Solution NaCl (sans contact avec le précipité) .. $n = 1,3344$ $\text{pH} = 6$
Solution CaCl_2 (sans contact avec le précipité) .. $n = 1,3365$ $\text{pH} = 7$ $T = 17^\circ$
Solution AlCl_3 (sans contact avec le précipité) .. $n = 1,3363$ $\text{pH} = 4$

RÉSISTIVITÉ DES ÉLECTROLYTES APRÈS CONTACT AVEC LE PRÉCIPITÉ :

Solution NaCl $R = 70 \varphi$
Solution CaCl $R = 50 \varphi$ $T = 17^\circ$
Solution AlCl $R = 60 \varphi$



Nous avons dans cette troisième expérience opéré sur quatre précipitations de 21 cc. (Nous avons augmenté les doses de mélange de sérums afin d'obtenir plus d'exactitude encore dans nos mesures).

Après 24 heures d'étuve, les tubes ont été mis à l'obscurité durant quatre jours (tubes stériles et bouchés au coton). Durant ce laps de temps la précipitation semble avoir continué : en effet, au moment où nous avons centrifugé, nous avons noté de légers flocons au sein du liquide et ce dernier était louche.

Nous avons lavé le précipité comme de coutume, soit trois fois avec 21 cc. d'eau distillée chaque lavage étant précédé d'une centrifugation de 10'.

Chaque fois le précipité repart très facilement en suspension dans le liquide qui devient bleuté et d'un louche homogène.

Après addition des solutions d'électrolytes, sans dessiccation du précipité sous le vide on a un liquide homogène, louche, bleuté et sans dépôt dans 1, 2, 3. Dans 4, le liquide est limpide et on remarque un dépôt.

Après deux heures de contact (sans agitation) 4 est le tube le plus clair et présente un précipité, les 3 autres tubes sont louches et sensiblement identiques.

Après deux heures (avec agitation) 1, 2 et 3 sont louches; 4 a un précipité granuleux et le liquide reste nettement limpide (ceci est probablement dû au pH de la solution N/5 d' AlCl_3).

Ensuite, nous avons centrifugé, décanté, desséché sous le vide et pesé.

Poids des tubes vides :

50 grs. = Tube 1 + 5,019

50 grs. = Tube 2 + 6,351

50 grs. = Tube 3 + 5,2429

50 grs. = Tube 4 + 4,7995

Poids des tubes avec précipité :

50 grs. = Tube 1 + précipité + 4,999

50 grs. = Tube 2 + précipité + 6,331

50 grs. = Tube 3 + précipité + 5,224

50 grs. = Tube 4 + précipité + 4,7825

Poids des précipités de 21 cc. de mélange :

Précipité n° 1 : $P = 0,020$

Précipité n° 2 : $P = 0,020$

Précipité n° 3 : $P = 0,0189$

Précipité n° 4 : $P = 0,0179$

Poids des tubes avec précipité ayant été en contact avec les électrolytes puis lavés :

50 grs. = Tube 1 + précipité + 5,0145

50 grs. = Tube 2 + précipité + 6,3455

50 grs. = Tube 3 + précipité + 5,238

50 grs. = Tube 4 + précipité + 4,7985

Poids des précipités après contact avec les électrolytes et lavages avec eau distillée :

Précipité n° 1 : $P = 0,0045$

Précipité n° 2 : $P = 0,0055$

Précipité n° 3 : $P = 0,0049$

Précipité n° 4 : $P = 0,0010$

Ces dernières pesées tendraient à nous faire supposer que l'expérience de Bordet sur la « réagglutination » n'est pas applicable à la précipitation.

En effet, pour des précipités sensiblement égaux et d'un poids moyen de 0 gr. 020, nous avons obtenu par des lavages successifs à l'eau distillée (tube n° 1) une diminution de poids de 75 0/0 environ ; il en est de même, à très peu près, pour ceux ayant été en contact avec les électrolytes.

Nous aurions désiré pratiquer un quatrième essai, mais le manque de nérum de lapin anti-cheval ne nous l'a pas permis.

Nota. — Nous avons pesé et centrifugé nos sérums dans des tubes de verre pyrex.

CHAPITRE IV

Reproduction de l'expérience de Bordet sur l'agglutination

Devant l'insuccès de nos diverses tentatives de reproduction de l'expérience de Bordet appliquée à la précipitation, nous avons jugé bon de reproduire cette expérience, en suivant intégralement les données de son auteur.

Tentatives de reproduction de l'expérience de Bordet au moyen du bacille de Shiga et du sérum anti-Shiga

Premier essai : Nous avons obtenu les résultats suivants :

1° Les résultats paraissent inverses lorsque le sédiment microbien est lavé 4 fois à l'eau distillée, c'est-à-dire que

les microbes semblent plus dispersés dans la solution de chlorure de sodium que dans l'eau distillée.

2° Les résultats sont nuls, lorsque le sédiment microbien n'a pas été lavé, c'est-à-dire qu'on a sensiblement le même aspect avec l'eau distillée et avec la solution de chlorure de sodium.

Deuxième essai : Cet essai nous a donné des résultats à peu près identiques avec l'eau distillée et avec la solution de chlorure de sodium; cependant, le sédiment microbien en contact avec le chlorure de sodium semble un peu plus difficile à faire repartir en émulsion dans la solution chlorure de sodium que dans l'eau distillée.

Troisième essai : Des cultures de bacilles de Shiga de 48 heures ont été émulsionnées après raclage très léger et très minutieux des boîtes de Petri et nous avons procédé à des agglutinations avec les 3 tubes suivants :

C) Emulsion de bacilles de Shiga (10 à 12 cc.) + 4 gouttes de sérum anti-Shiga. L'émulsion a été centrifugée durant 2' environ à une vitesse modérée.

N. C.) Emulsion de bacilles de Shiga + sérum anti-Shiga, sans centrifugation ni décantation.

D) Après préparation de l'émulsion nous avons remarqué au fond du tube un dépôt de 2 m/m de diamètre environ, aussi avons-nous décanté avant d'ajouter le sérum anti-Shiga.

L'agglutination s'étant effectuée, dans 2 tubes de chaque catégorie, la centrifugation, la décantation et le remplacement du liquide surmontant l'agglutinat par un volume égal d'eau bidistillée donne une émulsion que

l'on ne peut détruire; donc l'expérience de Bordet est vérifiée dans sa première partie.

Le remplacement de l'eau distillée louche par un même volume d'eau bidistillée dans les 2 tubes, puis l'addition dans l'un d'eux de 1 cc. environ de solution saturée de chlorure de sodium et la centrifugation donnent des résultats identiques dans les 2 tubes, c'est-à-dire un liquide surnageant homogène et bleuté. La réagglutination n'a donc pas eu lieu.

Enfin, en suivant rigoureusement la technique de Bordet, les 2 tubes présentent des liquides louches analogues. A la centrifugation on obtient des culots très sensiblement égaux.

Le résultat de ces tentatives est donc négatif, mais peut-être est-il dû à l'agglutination spontanée du bacille de Shiga (dont le mécanisme serait alors différent de celui de l'agglutination spécifique). C'est pourquoi nous avons cru utile de reproduire l'expérience de Bordet en nous servant d'un autre microbe.

Reproduction de l'expérience de BORDET au moyen du microbe para B et du sérum anti-para B

Cette expérience nous a donné des résultats très nettement positifs, c'est-à-dire conformes à ceux décrits par Bordet.

Nous avons alors repris cette expérience de la façon suivante :

4 tubes renfermant chacun un mélange de para-B et de sérum anti-para-B ont été centrifugés après agglutination et les liquides surnageant les sédiments microbiens ont été remplacés par un volume égal d'eau distillée ou de solutions de chlorure de sodium à 2 0/00, 8 0/00 et 100 0/00, ainsi que l'indiquent les tubes ci-contre :

Tube 1	Tube 2	Tube 3	Tube 4
H ² O	NaCl 2 0/00	NaCl 8 0/00	NaCl 100 0/00

L'observation de ces tubes nous montre :

Après 70' de très légers flocons dans le tube 2, rien dans les autres tubes.

Après 80' des flocons un peu plus nets et une faible tendance à la réagglutination dans 2. Dans 1, 3 et 4, l'aspect est toujours inchangé.

Après 95' des flocons assez nets et un début de réagglutination dans 2, de légers flocons et un début de réagglutination également dans 3. 1 et 4 ne présentent pas de changement.

Après 105' des flocons nets et réagglutination dans 2 et 3. 1 et 4 sont identiques à ce qu'ils étaient au début de l'observation.

D'autre part nous avons constaté qu'un tube renfermant des microbes agglutinés et de l'eau bidistillée ne donne un début de réagglutination par addition de cristaux de chlorure de sodium qu'au bout de 150' environ.

CHAPITRE V

Discussion

Dans les pages précédentes nous avons relaté les expériences que nous avons réalisées. L'ordre suivi dans cet exposé peut paraître à première vue illogique. Il s'explique cependant, croyons-nous, car, étant l'ordre chronologique des faits, c'est celui qui nous a paru le plus apte à refléter exactement nos expériences.

Les déterminations des constantes physico-chimiques ont été exécutées avec le plus grand soin, à de nombreuses reprises et au moyen d'appareils d'une précision et d'une sensibilité suffisamment grandes pour que nous puissions les donner comme exactes.

Ainsi que nous l'avons déjà mentionné, il est normal de n'attacher aucune importance aux différences de valeurs absolues des résultats que nous donnons. En effet, seules les valeurs comparées des constantes physiques des sérums ont un intérêt pour nous.

Nous avons ensuite vérifié l'atténuation des propriétés précipitantes des précipitines par la chaleur (60°). Nous

avons constaté que ces mêmes propriétés ne paraissaient pas sensiblement altérées par une dessiccation de 200 heures sous le vide sulfurique, ni par la dilution.

Les essais d'application de l'expérience de Bordet que nous avons tentés sont assurément de valeurs différentes. La première expérience n'a qu'une valeur indicative car nous avons opéré d'une façon approximative; elle ne constitue en somme qu'un essai préliminaire. La deuxième expérience que nous avons réalisée nous a paru insuffisante elle aussi, car nous avons opéré sur des quantités de mélanges de sérums relativement faibles; mais, une troisième expérience pratiquée au moyen de la totalité du sérum de lapin anti-cheval qui était en notre possession nous ayant donné des résultats très analogues, nous avons cru pouvoir conclure.

Les résultats obtenus ayant été négatifs nous avons tenté de reproduire l'expérience de Bordet telle que l'avait réalisée son auteur, c'est-à-dire sur le phénomène de l'agglutination spécifique. Un premier essai réalisé au moyen du bacille de Shiga et de sérum anti-Shiga a été négatif. Cet insuccès est probablement dû à une différence possible entre le mécanisme de l'agglutination spontanée du bacille de Shiga et celui de l'agglutination spécifique des microbes par les immunsérums correspondants.

Ceci justifie donc et explique notre nouvelle expérience sur le para-B qui nous a donné des résultats très nets. Au cours de ce dernier travail nous avons enfin pu constater la relation inverse qui semble exister entre la « réagglutination » et la concentration de la solution d'électrolytes employée.

Conclusions

I. — La précipitation spécifique des sérums suit la deuxième loi de Michaelis et Fleishmann, à savoir: « Si on ajoute à une quantité donnée de précipitine des quantités progressives de précipitogène, la masse du précipité obtenue croît d'abord proportionnellement puis décroît et tend vers zéro pour un certain excès de précipitogène. »

II. — Parmi les constantes physiques étudiées au cours du phénomène de la précipitation, deux d'entre elles, la tension superficielle et la résistivité, ne semblent pas modifiées, tout au moins dans les limites de précision de nos expériences. L'indice de réfraction présente des variations normales, qui sont en rapport avec les quantités d'albumines précipitées.

III. — Le « temps de dilution des sérums » (p. 34) n'a aucun rôle sur la quantité de précipité obtenue; c'est tout au plus s'il paraît accroître très légèrement la vitesse de formation du précipité.

IV. — Dans les conditions de précipitation optima des sérums de cheval et de lapin anti-cheval la quantité

d'albumines précipitées après 24 heures d'étuve à 38° est sensiblement de 5 0/0 des albumines totales des sérums.

V. — Les précipitines perdent une grande partie de leurs propriétés précipitantes par chauffage à 60-62° durant 30 minutes.

VI. — Les précipitines ne semblent pas modifiées par une dilution au 1/10 dans l'eau salée à 8 0/00 durant 120 heures et ne sont pas altérées par une dessiccation de 200 heures sous le vide sulfurique.

VII. — La précipitation est un phénomène d'une longue durée, et qui se poursuit durant 100 heures au moins.

VIII. — L'expérience de Bordet (action des électrolytes sur le sédiment microbien obtenu par centrifugation après agglutination) ne semble pas s'appliquer à la précipitation et la valence des électrolytes ne semble pas avoir un rôle appréciable.

Le pH par contre a une action nette (action précipitante des solutions acides).

IX. — En ce qui concerne le phénomène d'agglutination, l'action « réagglutinante » des électrolytes (chlorure de sodium en particulier) semble être plus notable avec des solutions faibles (2 et 8 0/00); des solutions très concentrées (100 0/00) auraient au contraire un effet inhibiteur.

X. — Nous signalons que l'expérience de Bordet, effectuée avec le bacille de Shiga et le sérum anti-Shiga, ne nous a pas donné les résultats attendus, malgré trois tentatives.

Ce fait paraît intéressant : il semblerait indiquer, le bacille de Shiga s'agglutinant comme on sait d'une façon spontanée, que le mécanisme de cette agglutination spontanée pourrait être différent de l'agglutination par les sérums spécifiques correspondants.

Vu :	LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE,
LE DOYEN,	MOREL.
JEAN LEPINE.	

Vu et permis d'imprimer

LYON, le 24 Novembre 1930

LE RECTEUR, PRÉSIDENT DU CONSEIL DE L'UNIVERSITÉ.
JOSEPH GHEUSI.

Bibliographie

- BECHHOLD, — Die Ausflockung von Suspensionen bzw. Kolloiden und die Bakterienagglutination. (*Zeitchr. f. Physik, Chem.* 48, 385, 1904).
- Die Kolloide in Biologie und Medizin. Dresden und Leipzig, Theodor Steinkopff, 1928.
- BILTZ (W.). — Ein Versuch zur Deutung der Agglutinationsvorgänge (*Zeitschr. f. physik. Chem.* 48, 615, 1904).
- BORDET (J.). — (*Annales de l'Institut Pasteur*, 1891, T. IX, p. 462).
- (*Ann. Inst. Past.*, octobre 1898-avril 1899),
- Mécanisme de l'agglutination. (*Ann. de l'Inst. Past.* 1899 (13), 225).
- Traité de l'immunité dans les maladies infectieuses. (*Masson et Co*, Paris 1920, p. 287-302, p. 331-348).
- BRUN (L.). — Recherches sur le « phénomène de Zone ou paradoxal ». (*Thèse médecine Lyon, Imprimerie Bosc Frères et Riou*, Lyon 1928),
- BUCHANAN. — Agglutination. (*Journ. Of. Bact.*, 4, 73, 1919).
- CHARRIN et ROGER. — Note sur le développement des microbes pathogènes dans le sérum des animaux vaccinés. (*C. R. Soc. Biol.*, 41, 667, 1889).
- COSTA-CRUZ. — Etude de l'optimum d'agglutination. (*C. R. Soc. Biol.*, 100, 932, 1929).

- DEAN (H.-R.).— The Relation between the fixation of complement and the formation of a precipitate. (*Zeitschr. f. Immunitäts f. Orig.*, t. XIII, p. 84-122, 1913).
- DE LAVERGNE, FERNIER (L.) et LEVY (R.). — (*C. R. de la Soc. Biol.*, 1929 t. C., p. 113).
- DEMEES (Oscar). — Précipitines et Précipitables. (*La Cellule*, 1907, t.XXIV, p. 315-352).
- DOURIS (R.) et RICARDONI (J.). — Sérums et anti-sérums précipitants. (*Bull. Sciences Pharmacol.*, 1924),
- DUCLAUX. (J.) — Les colloïdes, (*Gauthier-Villars et C^{ie}*, Paris 1928).
- DURHAM. — The agglutinating or sedimenting properties of sera and their relation of immunity. (*Lancet* 2, 446, 1898).
- EISENBERG. — Weitere Untersuchungen über den Mechanismus der agglutination und Präzipitation. (*Centralbl. f. Bakt.*, 1, 41-358, 1906).
- EISENBERG (P.) und VOLK (R.). — Untersuchungen über die agglutination. (*Zeitschr. f. Hyg.*, 40, 155, 1902).
- ETIENNE-MARTIN et ROCHAIX (A.). — Sur le « phénomène paradoxal » dans la réaction d'Uhlenhüt. (*Ann. de Méd. légale*, janvier 1928, p. 47).
- FABRY (P.) et MALVOZ (E.). — Sur l'agglutination des microbes atténués. (*C. R. Soc. Biol.*, 85, 237, 1921).
- FREDERIC (P.), GAY. — The fixation Reaction in relation to the formation of specific Serum Precipitates. (*Univ. California Public in Pathol.*, 1911, t. II, p. 1-22).
- FRIEDBERG. — (*Cent. f. Bakt.* 1901 (30), 336).
- FRIEDMANN. — (*Arch. f. Hyg.* 1906. (55), 361).
- GENGOU. — Recherches sur l'agglutination dans le Charbon et les relations entre les diverses propriétés du sérum. (*Arch. intern. de Pharm. et de Thérap.*, 6, 289, 1899).

- GRUBER et DURHAM. — Eine neue Methode zur raschen Erkennung der Cholera-vibrien und der Typhusbazillus. (*Münch Med. Wochenschr.*, 6, 285, 1896).
- HIRSH (E.-F.). — Hydrogen-ion Studies III. Hydrogen-ion changes in the agglutination of bacteria by immunsérum. (*Journal Infect. Dis.*, 30, 651, 1922).
- HOLLANDE et GATE. — (*Comptes rendus de la Soc. de Biol.* 1915, oct.).
- ISAEFF. — Contribution à l'étude de l'immunité acquise contre le pneumocoque. (*Ann. Inst. Past.*, 7, 269, 1893).
- JOOS (A.). — Untersuchungen über die verschiedenen agglutinine der Thyphus-sérums. (*Centralbl. f. Bakct.* I, 33, 762, 1903).
- JOUSSET (A.). — Les sérums antituberculeux. Précipito-diagnostic de la tuberculose. (*C. R. Soc. Biol.* t. LXVI 18 déc. 1909, p. 708).
- KOPACZEWSKI (W.). — Théorie et pratique des colloïdes en biologie et en médecine. (Paris-Vigot, 1923, p. 197).
- KRAUSS (R.). — Über spezifische Reaktionen in keimfreien Filtraten aus Choléra, Thyphus, Pestbazillenkulturen, eszeugt durch homologes serum. (*Wien. Klin. Wochenschr.*, 10, 736, 1897).
- Prazipitine. (Bakterien präzipitine). (*in Kolle und Wassermann*, 2, 732, 1913).
- KRAUS und SENG. — Mechanismus der agglutination. (*Wien. Klin. Wochenschr.*, 12, I, 1899).
- LE BOURDELLES (B.) et ROCHAIX (A.). — (*C. R. de la Soc. de Biol.*, 18 février 1929, t. C, p. 677).
- MALVOZ (E.). — Sur la présence d'agglutinines spécifiques dans les cultures microbiennes. (*Ann. Inst. Past.*, 13, 630, 1899).

- MALVOZ (R.). — Recherches sur l'agglutination de *B. typhosus* par des substances chimiques. (*Ann. Inst. Past.* II, 582, 1897).
- MANGIN, GIRARD et HENRI V.). — Vérification expérimentales de la théorie de l'agglutination des globules rouges. (*C. R., Soc. Biol.*, II, 56, 38, 1904).
- MESNIL. — (*C. R. de la Soc. Biol.*, 26 janvier 1929).
- METCHNIKOFF. — *Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1891. (T. V., p. 473)
- NEISSER und FRIEDMANN. — Studien über Ausflockungserscheinungen Beziehungen zur Bakterienagglutination. (*Münch. med. Wochenschr.*, 51, 827, 1904)
- NICOLLE (Ch.). — Recherches sur la substance agglutinée. (*Ann. Inst. Past.*, 12, 161, 1898).
- L'Agglutination spontanée des cultures, ses rapports avec l'agglutination par les sérums. (*C. R. soc. Biol.*, 12, 1054, 1898).
- NICOLLE (Ch.) et HALIPIER. — (*Ann. Inst. Past.* 1902, p. 221).
- NOBLAT (A.-M.). — Observations sur le mécanisme de l'agglutination, phénomène de Charrin et Roger. (*Thèse pharmacie*, Nancy 1929).
- NORTHROP et DE KRUIF. — (*Journ. Gén. Physiol.*, 1922, (4) 655).
- PALTAUF, RICHARD. — Die agglutination. (*Kolle und Wassermann in Handb. d. pathog. Mikroorg.*, 2, 483, 1913).
- PIETTRE (M.) et CHRETIEN (A.). — Influence de quelques électrolytes sur les phénomènes d'agglutination. (*C. R. Acad. Sc.*, 185, 1319, 1927).
- PORGES (O.). — Über die Beziehungen zwischen Bakterienagglutination und Ausflockungserscheinungen der Kolloide. (*Centralbl. f. Bakt.*, I, 40, 133, 1905).

- ROCHAIX (A.), LE BOURDELLES (B.) et BRUN (L.). — Sur le mécanisme du « phénomène de zone ou paradoxal » dans la précipitation spécifique. (*C. R. Soc. Biol.*, 100, 675, 1929).
- ROCHAIX (A.), LE BOURDELLES (B.) et CHEVALLIER (A.). — Sur le mécanisme du phénomène de zone dans la précipitation spécifique. Rôle des électrolytes. (*C. R. Soc. Biol.* T. CII, p. 447, 1929).
- SHIONOYA, TAKUJI. — The effect of ions upon agglutination. (*The Lancet London*, 2, 905, 1922).
- TCHISTOVITCH. — (*Ann. Inst. Past.*, 1899, t. XIII, p. 413).
- TEAGUE (O.) und BUXTON (B-H.). — Die agglutination in physikalischer Hinsicht, II. Ein Vergleich verschiedener Suspensionen. (*Zeitschr. f. phys. che.*, 57, 64, 1907).
- TRAUBE (J.). — Osmose, diffusion, tension superficielle et solubilité. (*Journ. de Chimie physique*, III, 583, 1905).
- UHLENHUTH. — (*Deut. Méd. Wochen*, 1901, n° 6, p. 280, n° 30 ; *Centr. f. Bact.*, 1901, t. 29).
- WASSERMANN (A.). — Über agglutinine und Präzipitine. (*Zeitschr. f. Hyg.*, 42, 267, 1903).
- WASSERMANN et SCHUTZE. — (*Berlin Klin. Woch.*, 1901, n° 7).
- WELLS (H.-G.). — Les aspects chimiques de l'immunité. (Gaston Doin, édit., Paris 1928).
- WIDAL et SICARD. — Sur les affections paratyphoïdiques et le séro-diagnostic de la fièvre typhoïde. (*Bull. Soc. Méd. des Hôpitaux*, 13, 655, 1896).
- Différenciation du bacille typhique et du bacille de psittacose par la réaction agglutinante. (*C. R. Soc. Biol.*, 2^e série, 3, 991, 1896).
- Etude sur le séro-diagnostic. (*Ann. Inst. Past.*, II, 353, 1897).

TABLE DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS	9
INTRODUCTION.	11
<i>Chapitre premier.</i> — Recherches antérieures sur le mécanisme de l'agglutination et de la précipita- tion spécifique	13
<i>Chapitre II.</i> — Détermination des modifications de quelques constantes physiques des sérums em- ployés pendant la précipitation spécifique	31
<i>Chapitre III.</i> — Essais d'application de l'expérience de Bordet à la précipitation spécifique	41
<i>Chapitre IV.</i> — Reproduction de l'expérience de Bor- det sur l'agglutination spécifique	49
<i>Chapitre V.</i> — Discussion	53
CONCLUSIONS	55
BIBLIOGRAPHIE.	59

